

# Chapitre III

## Caractérisation des formes native et dénaturée de la néocarzinostatine.

L'objectif de ce chapitre est de décrire le plus précisément possible, tant d'un point de vue structural que thermodynamique, les propriétés des solutions de NCS native et fortement dénaturée par la chaleur ou par le GdnHCl. La conformation de la protéine native en fonction du chlorure de guanidinium a été bien étudiée par diffusion de neutrons, et en fonction de la température par diffusion de rayons X.

La NCS à l'état natif a été principalement caractérisée par la mesure de sa taille et l'évaluation des interactions intermoléculaires. Les valeurs du rayon de giration obtenues par DXPA et DNPA sont bon en accord avec celle calculée à partir de la structure atomique, à condition de tenir compte de la couche d'hydratation. En ce qui concerne les états totalement dépliés, nous montrons qu'ils ont des propriétés similaires à ceux des polymères de longueur finie. Cette similitude a été exploitée pour déterminer la valeur de la longueur statistique de la chaîne polypeptidique.

### 3.1 La NCS à l'état natif

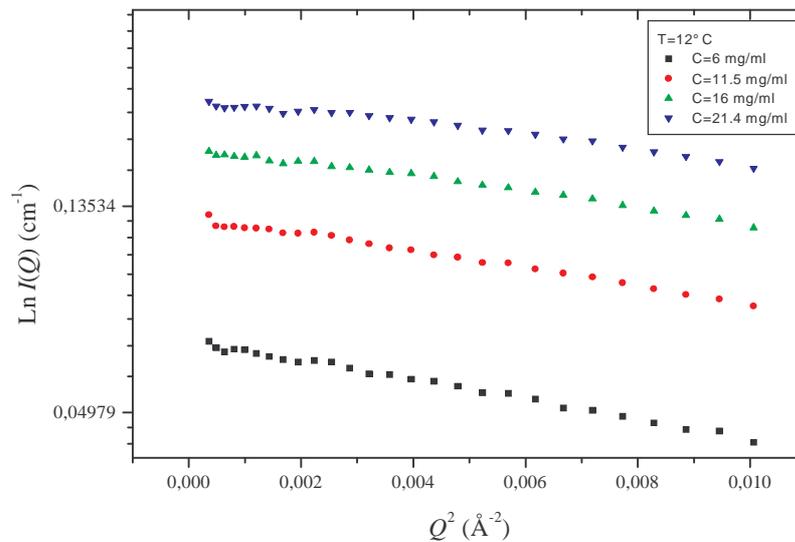
La première étude que nous avons entreprise concerne l'état natif de la NCS. En effet, toute étude du repliement d'une protéine nécessite d'en connaître à la fois les états initial et final. A cette fin, nous avons essentiellement utilisé les résultats de la diffusion des neutrons et des rayons X aux petits angles pour déterminer le rayon de giration de la NCS native et évaluer les interactions intermoléculaires. Quelques résultats supplémentaires ont aussi été obtenus sur les propriétés dichroïques inhabituelles de la NCS et sur la variation de son rayon hydrodynamique en fonction du pH de la solution.

#### 3.1.1 Détermination du rayon de giration et du second coefficient du viriel

Le but des expériences de diffusion aux petits angles sur la protéine native était d'une part de *déterminer le rayon de giration extrapolé à concentration nulle*, et d'autre part de *vérifier que les interactions intermoléculaires, dans les conditions ioniques choisies, étaient suffisamment faibles pour que des informations précises puissent être obtenues sur la conformation de la protéine lors de la dénaturation*.

##### 3.1.1.1 Expériences de neutrons

La figure 3.1 représente le logarithme de l'intensité des neutrons diffusés,  $\ln I(Q)$ , en fonction de  $Q^2$ , pour quatre concentrations de protéine différentes comprises entre 6 et 21,4 mg cm<sup>-3</sup>. En utilisant l'approximation de Guinier nous avons déterminé, pour chaque concentration, les valeurs de l'intensité diffusée vers l'avant,  $I(0,c)$ , et du rayon de giration apparent,  $R_g(c)$ .



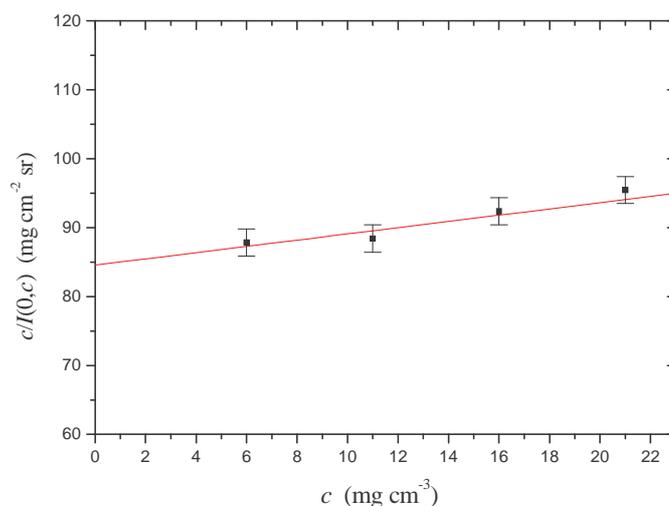
**Fig. 3.1 :** représentation de Guinier des spectres de diffusion des neutrons,  $I(Q)$ , de la NCS native à différentes concentrations.

La figure 3.2 représente la quantité  $c/I(0,c)$  en fonction de la concentration,  $c$ , de protéine. Dans la limite des barres d'erreur, cette quantité présente une dépendance linéaire, et croissante avec la concentration. Son comportement laisse supposer qu'il n'y a pas de contribution significative du troisième coefficient du viriel. Il montre aussi que le second coefficient du viriel,  $A_2$ , est positif et donc que les interactions intermoléculaires sont répulsives dans un tampon phosphate 60 mM. Des résultats présentés dans la figure 3.2, nous déduisons les valeurs suivantes :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{I(0,c)}{c} = (11,9 \pm 0,2) \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ sr}^{-1}$$

$$A_2 = (2,7 \pm 1) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}.$$

La valeur mesurée de  $\lim_{c \rightarrow 0} I(0,c)/c$  est en bon accord avec celle qui peut être estimée ( $11,1 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ sr}^{-1}$ ) à l'aide des expressions (1.43) et (1.44), en utilisant la composition atomique de la NCS dont la masse molaire est  $M = 11235 \text{ g mol}^{-1}$  dans l' eau lourde, et en utilisant pour le volume spécifique partiel la valeur calculée à partir de ceux des divers acides aminés donnés par Jacrot (1976), qui est égale à  $v = 0,74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .



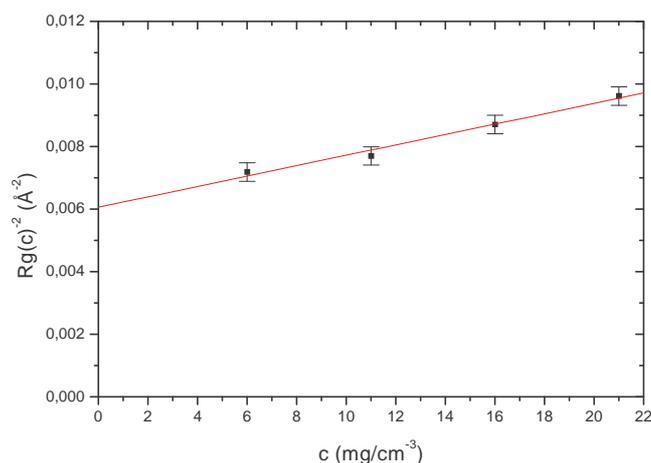
**Fig.3.2 :** détermination du second coefficient du viriel  $A_2$  de la NCS native.

La figure 3.3 représente les variations de  $[R_g(c)]^{-2}$  en fonction de la concentration de protéine. La valeur du rayon de giration à concentration nulle est :

$$R_g(0) = (12.9 \pm 0.3) \text{ \AA}$$

et celle du coefficient  $B_2$  de l'expression (1.72) est :

$$B_2 = (12 \pm 4) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}.$$



**Fig. 3.3 :** rayon de giration de la protéine native en fonction de la concentration.

On observe sur la figure précédente que le rayon de giration mesuré par diffusion de neutrons varie assez fortement avec la concentration dans la gamme [6 - 21 mg cm<sup>-3</sup>], ce qui conduit à un coefficient  $B_2$  relativement important. Cependant, il est clair que les barres

d' erreur sur ce coefficient, comme d' ailleurs sur le coefficient du viriel, sont grandes, en raison du fait que nous n' avons effectué des mesures que pour 4 valeurs de la concentration en NCS. Il faut donc considérer que les valeurs données pour ces coefficients représentent seulement des ordres de grandeur, qui sont toutefois suffisants pour renseigner sur les interactions intermoléculaires. Nous reviendrons sur ce point dans la suite.

### 3.1.1.2 Expériences de rayons X.

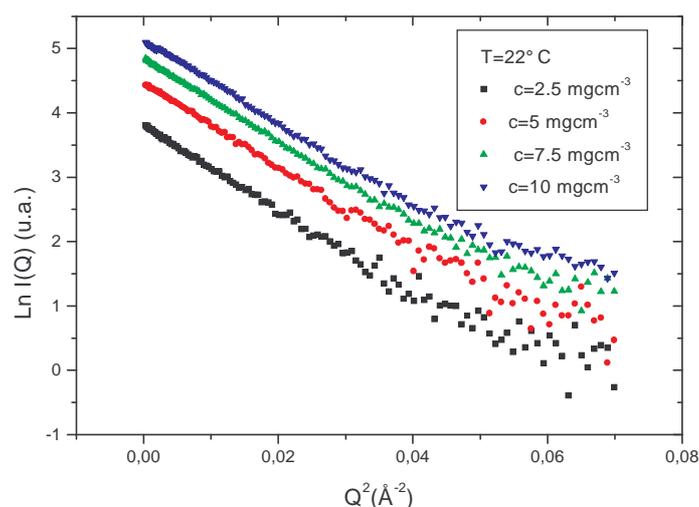
Des mesures semblables ont été faites avec les rayons X dans un domaine de concentration de protéine légèrement différent : de 2.5 à 10 mg cm<sup>-3</sup>. Les résultats sont donnés dans la figure 3.4. En procédant de la même façon que pour les mesures de DNPA, nous obtenons pour le coefficient du second coefficient du viriel :

$$A_2 = (3.5 \pm 2) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}.$$

Nous ne donnons pas de valeur de  $\lim_{c \rightarrow 0} I(0, c)/c$  car, en général, les spectromètres de DXPA ne sont pas conçus pour permettre d'être calibrés de manière absolue.

Nous obtenons également :

$$R_g(0) = (14.2 \pm 0.3) \text{ \AA} \quad \text{et} \quad B_2 = (2.9 \pm 0.7) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}.$$



**Fig. 3.4 :** représentation de Guinier des spectres de diffusion des rayons X,  $I(Q)$ , de la NCS native à différentes concentrations.

Quand on augmente la température, la protéine garde une structure compacte jusqu' à 60°C au moins (dans l' eau légère), puis transite vers l' état dénaturé, avec un point de demi transition aux alentours de 68°C. Dans le cadre de l' étude de cette transition, il est important de connaître les interaction intermoléculaires quand la protéine est encore native, juste avant la transition de dénaturation. C' est pourquoi nous avons effectué des mesures analogues à 52°C. Elles conduisent à un rayon de giration extrapolé à concentration nulle identique à celui déterminé à température ambiante :  $R_g(0)=(14.2\pm 0.3)$  Å. Le deuxième coefficient du viriel  $A_2$  et le coefficient  $B_2$  ont par contre légèrement augmenté : ils ont tous deux une valeur de l' ordre de  $\pm 2 \cdot 10^{-4}$  cm<sup>3</sup> mol g<sup>-2</sup> à 52°C.

### 3.1.1.3 Commentaires

#### Sur les rayons de giration

Le rayon de giration  $R_g(0)$  de la protéine native, extrapolé à concentration nulle, a une valeur sensiblement plus faible en neutrons dans D<sub>2</sub>O (12.9 Å) qu' en rayons X (14.2Å). Il s' agit en fait d' un phénomène tout à fait général, qui a son origine dans l' existence d' une première couche d' hydratation de la protéine plus dense que le solvant en volume (Svergun et al., 1998). Dans une expérience de diffusion des rayons X, cette couche d' hydratation plus dense va produire une amplitude de diffusion supplémentaire, avec un terme de contraste positif, qui s'ajoute à l' amplitude de diffusion de la protéine, dont le contraste est également positif. Il s' ensuit que la particule paraîtra plus grosse. Dans une expérience de diffusion des neutrons dans D<sub>2</sub>O, l' amplitude de diffusion supplémentaire due à la couche d' hydratation plus dense a toujours un contraste positif, mais la protéine a cette fois un contraste négatif par rapport au solvant. L' amplitude de diffusion supplémentaire s' *etranche* alors de celle de la protéine, qui paraît plus petite.

Afin de quantifier la densité de la première couche d' hydratation, nous avons utilisé les programmes CRY SOL et CRY SON, développés par Svergun pour évaluer l' intensité diffusée par des macromolécules en solution, à partir de leur structure cristallographique, en rayons X et en neutrons respectivement (Svergun et al., 1995). Ces programmes calculent l' intensité diffusée par une molécule entourée d' une couche d' hydratation d' épaisseur  $\Delta$ , de la façon suivante :

$$I(Q) = \left\langle \left| A_a(Q) - \rho_s A_s(Q) + \delta\rho_b A_b(Q) \right|^2 \right\rangle$$

où  $A_a(Q)$  est l'amplitude de diffusion de la particule *in vacuo* évaluée à partir des coordonnées atomiques,  $A_s(Q)$  et  $A_b(Q)$  sont les amplitudes de diffusion du volume de solvant exclu et de la couche d'hydratation, respectivement,  $\epsilon\delta\rho_b$  représente le contraste  $\rho_b - \rho_s$  de la couche d'hydratation par rapport au solvant. L'ajustement de cette expression aux courbes de diffusion déterminées expérimentalement permet d'évaluer  $\delta\rho_b$ , et d'en déduire la densité de la première couche d'hydratation.

Nous avons réalisé cet ajustement dans le cas de la NCS en utilisant les coordonnées atomiques issus de la PDB (référence 1noa), et les courbes de diffusion des rayons X et des neutrons  $I(Q, c=0)$  extrapolées à concentration nulle à partir de l'expression (1.74). L'ajustement est excellent ; en particulier il conduit à des rayons de giration théoriques identiques à ceux déterminés expérimentalement. La densité relative de la couche d'hydratation est trouvée égale à 1.04 et 1.045 en rayons X et en neutrons respectivement. La couche d'hydratation a donc une densité supérieure à celle du solvant en volume de 4 à 5% environ, (à comparer à l'augmentation de 6 à 7% trouvée dans le lysozyme, Svergun et al., 1998).

### Sur les interactions

Le second coefficient du viriel  $A_2$  est une mesure des forces d'interaction entre les macromolécules de la solution, qui sont des forces faibles d'origines diverses (composantes électrostatiques, de van der Waals et liaisons hydrogène, contributions hydrophobes et d'hydratation). Il est d'usage, pour modéliser ces interactions, d'utiliser le potentiel d'interaction appelé potentiel DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek), qui inclut les interactions de corps durs, des interactions électrostatiques coulombiennes répulsives, et des forces attractives de van der Waals (voir par exemple Tardieu et al., 1999). La valeur du coefficient  $A_2$  dépend essentiellement des amplitudes relatives de ces trois types d'interaction. Pour une même protéine, elle peut varier dans un large domaine, suivant l'écrantage des interactions électrostatiques par le sel ajouté dans la solution.

Pour tirer des informations des valeurs obtenues expérimentalement pour  $A_2$ , il est intéressant de les comparer au second coefficient du Viriel que l'on obtiendrait avec un seul potentiel de corps durs. Il a été établi théoriquement (des Cloiseaux J; et Janninck G., 1990) que pour des macromolécules en solution non chargées, le second coefficient du viriel et le rayon de giration sont reliés par l'expression suivante :

$$A_2 = 4\pi^{3/2}\Psi N_A \frac{R_g^3(0)}{M^2} \quad (3.1)$$

où  $N_A$  est le nombre d'Avogadro et  $M$  la masse molaire du soluté.  $\Psi$  est une constante universelle qui dépend de la forme ou de la conformation de la molécule. Pour des sphères dures:

$$\Psi = \frac{4}{3\pi^{1/2}} \left(\frac{5}{3}\right)^{3/2} \cong 1,619 \quad (3.2)$$

[Yvon, 1966 ;Douglas 1985).

Si l'on utilise pour le rayon de giration  $R_g(0)$  la valeur cristallographique obtenue à partir des données de la PDB (sans pondération par les longueurs de diffusion), qui est de 13.53 Å, on obtient à partir de la relation (3.1) une valeur de  $A_2$  de l'ordre de  $4.3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$ . On constate que cette valeur est du même ordre de grandeur que les déterminations expérimentales :  $A_2=2.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$  dans les expériences de neutrons à l'ambiante, et  $A_2=3.5$  et  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$  dans les expériences de rayons X, à 22 et 52°C respectivement. Ceci suggère que, dans les conditions ioniques choisies pour la NCS native, les interactions coulombiennes répulsives sont compensées par les interactions attractives de van der Waals, le potentiel d'interaction résultant se réduisant à un potentiel de sphères dures. Nous pouvons alors considérer que, pour un tampon 60 mM phosphate, les interactions électrostatiques entre molécules de NCS sont négligeables, ceci aussi bien dans  $\text{H}_2\text{O}$  (expériences de rayons X) que dans  $\text{D}_2\text{O}$  (expériences de neutrons), et dans toute la région en température où la protéine reste native. On peut alors raisonnablement supposer que, dans ces conditions, les changements de conformations de la protéine lors de la dénaturation ne seront pas masqués par des effets d'interactions.

On peut faire un commentaire sur les interactions, concernant l'augmentation observée pour le coefficient du viriel  $A_2$  quand la température croît, qui traduit un accroissement des répulsions. Ceci est un effet général qui a déjà été observé dans les solutions protéiques (Bonneté et al., 1999). Il est attribué au fait que la force des interactions attractives diminue quand la température augmente, alors que les interactions répulsives restent à peu près inchangées.

Enfin , comme nous venons de l'observer, la valeur du coefficient du viriel déterminée par rayons X en solution d'eau légère est légèrement plus grande que celle déterminée par

neutrons en eau lourde. Cela indique que *l'amplitude des interactions attractives* est plus importante pour la protéine en solution dans D<sub>2</sub>O que dans H<sub>2</sub>O. Le même type de comportement a été mis en évidence pour le lysozyme (Gripon et al., 1997). Gripon montre que les interactions, protéine-protéine, modélisées avec un potentiel DVLO, présentent des composantes attractives différentes en D<sub>2</sub>O et en H<sub>2</sub>O.

Lorsque les molécules sont centrosymétriques, il est aussi possible d'évaluer le coefficient B<sub>2</sub> qui décrit la dépendance du rayon de giration avec la concentration. En développant les expressions (1.46), (1.65), (1.66), au premier ordre en *c* et au second ordre en *Q*, on montre que :

$$B_2 = A_2 \frac{R_g'^2}{R_g^2}$$

où

$$R_g'^2 = \frac{\int [g(r) - 1] r^2 dr}{\int [g(r) - 1] dr}$$

avec

$$g(r) = \exp(-V(r)/RT) - 1$$

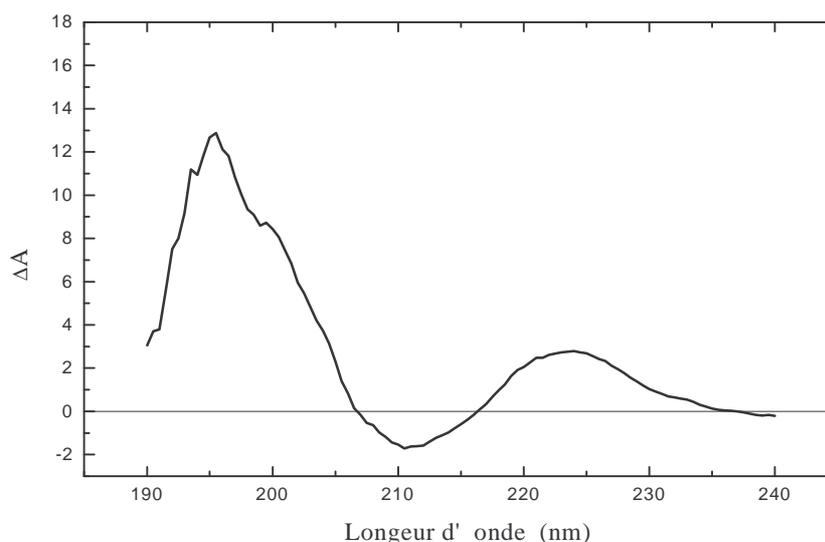
R<sub>g</sub>' est le rayon de giration *de la portée des interactions* intermoléculaires, sa valeur ne dépend pas du contraste, contrairement à R<sub>g</sub>.

Pour des sphères dures R<sub>g</sub>'=2R<sub>g</sub> et B<sub>2</sub>=4A<sub>2</sub>. C'est ce qu'on observe en diffusion des neutrons sur des solutions deutérées. Par contre dans l'eau légère la diffusion des rayons X montre que B<sub>2</sub> ≅ A<sub>2</sub>. Cela semblerait montrer que la *longueur de corrélation des interactions attractives* est plus grande dans le tampon à base d'eau légère que dans celui à base d'eau lourde.

### 3.1.2 Propriétés dichroïques

Le spectre dichroïque de la NCS native présente une particularité inhabituelle pour une protéine composée uniquement de feuillet β. Comme le montre la figure 3.5, ce spectre présente deux maxima. Le premier, qui correspond à des longueurs d'onde voisines de 195 nm, est caractéristique de la structure β. Par contre le second, situé aux alentours de entre 223 nm, est moins fréquemment observé. Il pourrait être dû à l'exposition au solvant d'un

chromophore aromatique qui masque l'activité optique du squelette peptidique normalement observé dans l'UV proche. Ceci pourrait bien être le cas de la NCS qui possède deux résidus tryptophane très externes. Un tel phénomène a déjà été observé pour plusieurs protéines possédant des résidus aromatiques exposés (Green, 1966 ; Woody, 1994 ; Dufton, 1983 ; Reid, 1998; Schindler 1995). D'autre part, la présence des deux boucles formées par les liaisons disulfures pourrait aussi être à l'origine de ce comportement dichroïque particulier.



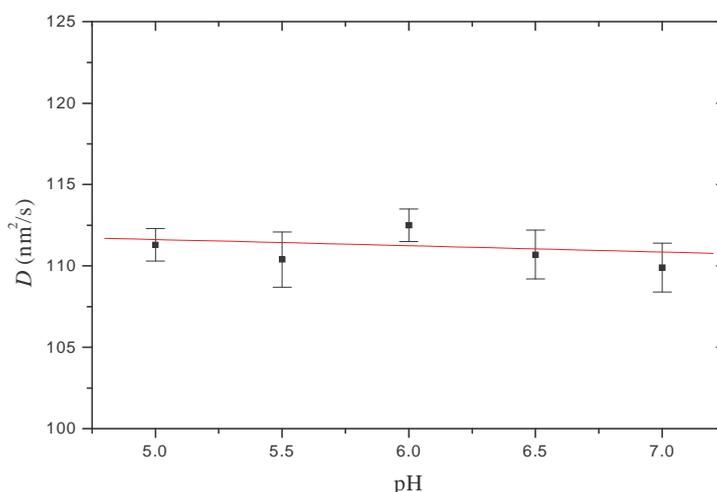
**Fig. 3.5 :** *spectre dichroïque de la NCS native à 20°C.*

### 3.1.3 Rayon hydrodynamique en fonction du pH.

En général, la configuration d'une protéine en solution dépend de la valeur du pH. Sachant que le point isoélectrique de la NCS est à pH 3, nous avons vérifié rapidement que la conformation de cette protéine n'était pas fortement affectée quand le pH varie entre 5 et 7. A cette fin nous avons utilisé la diffusion quasi-élastique de lumière pour mesurer le coefficient de diffusion de translation de la NCS dans l'eau légère à 20°C et obtenir son rayon hydrodynamique.

La figure 3.6 montre la variation du coefficient de diffusion,  $D$ , en fonction du pH. Entre pH=5 et pH=7, le coefficient de diffusion de la NCS reste constant, avec une valeur moyenne de  $(112 \pm 3) \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$ , qui suggère l'invariance des propriétés structurales de la NCS dans cet intervalle de pH. En utilisant la relation de Stokes-Einstein (2.56) nous avons

déterminé la valeur du rayon hydrodynamique,  $R_H$ , de la NCS en supposant que la viscosité des tampons est identique à celle de l'eau ( $\eta = 1.002$  à  $20^\circ\text{C}$ ). Sa valeur moyenne est  $R_H = (19,5 \pm 0,5) \text{ \AA}$ , quelque soit le pH. En première approximation, le rayon hydrodynamique d'objets sphériques compacts est identique au rayon géométrique,  $R$ . Si l'objet peut être considéré comme homogène et isotrope,  $R = (5/3)^{1/2}R_g$  où  $R_g$  est le rayon de giration. La valeur du rayon de giration de la NCS est comprise entre  $(12,9 \pm 0,3)$  et  $(14,2 \pm 0,3) \text{ \AA}$ , selon qu'elle est mesurée par diffusion des neutrons ou des rayons X, respectivement. Globalement, la relation entre le rayon hydrodynamique et le rayon de giration peut donc être considérée comme satisfaite.



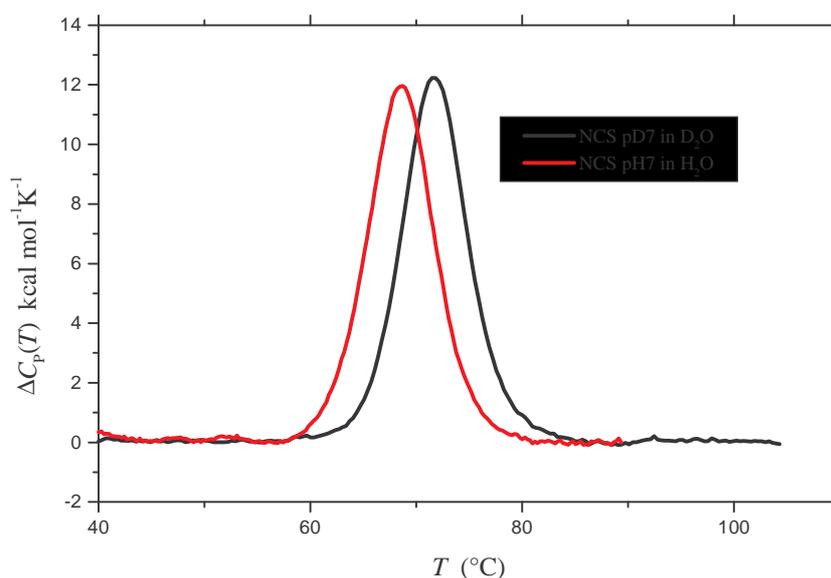
**Fig. 3.6 :** variation du coefficient de diffusion de la NCS en fonction du pH.

### 3.2 La NCS totalement dépliée

La NCS a été totalement dépliée par la chaleur et par du chlorure de guanidinium à concentrations élevées. Les mesures de DNPA et DXPA ont permis de mettre en évidence différents états conformationnels selon l'agent dénaturant, la chaîne polypeptidique pouvant se comporter comme une chaîne idéale ou présenter des interactions de volume exclu. Les paramètres structuraux de ces états dépliés ont été déduits des spectres de diffusion en utilisant certains résultats théoriques établis pour les homopolymères.

### 3.2.1 La chaleur spécifique

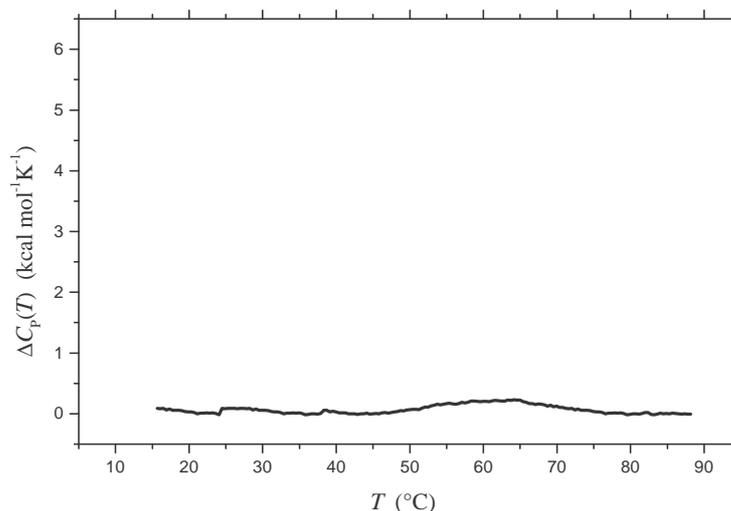
Des mesures de calorimétrie ont été faites dans des tampons à base d'eau légère ou d'eau lourde, à pH 7, pour déterminer la température à partir de laquelle la NCS est totalement dénaturée. Comme le montre la figure 3.7, les températures de transition sont 68.5°C et 71.8°C, respectivement. Quelque soit le tampon, la chaleur spécifique  $\langle \Delta C_p(T) \rangle$ , ne change plus au dessus de 80°C, ce qui indique que la protéine est complètement dénaturée. La variation d'enthalpie calorimétrique est de  $(97 \pm 1)$  kcal mol<sup>-1</sup> pour les deux tampons.



**Fig. 3.7 :** variation de la chaleur spécifique de la NCS en solution dans un tampon phosphate 60 mM, deutéré ou non.

Nous avons aussi mesuré, entre 20 et 88°C, la variation de la chaleur spécifique de la NCS dans une solution de 5 M de GdnDCI deutéré. La figure 4.8 montre qu'aucun pic de transition n'est observable. Les petites fluctuations, d'environ 0,25 Kcal mol<sup>-1</sup> d'amplitude, sont dues à l'appareil. Nous en déduisons qu'à cette concentration de dénaturant la protéine est totalement dénaturée à 20°C. L'absence totale de variation de la chaleur spécifique indique que la protéine, bien que complètement dépliée, conserve encore les deux boucles formées grâce aux deux ponts disulfure. Les ponts disulfure sont des liaisons covalentes très fortes, et

l'énergie provenant de la combinaison entre l'agent dénaturant et la température n'est pas suffisante pour les oxyder.

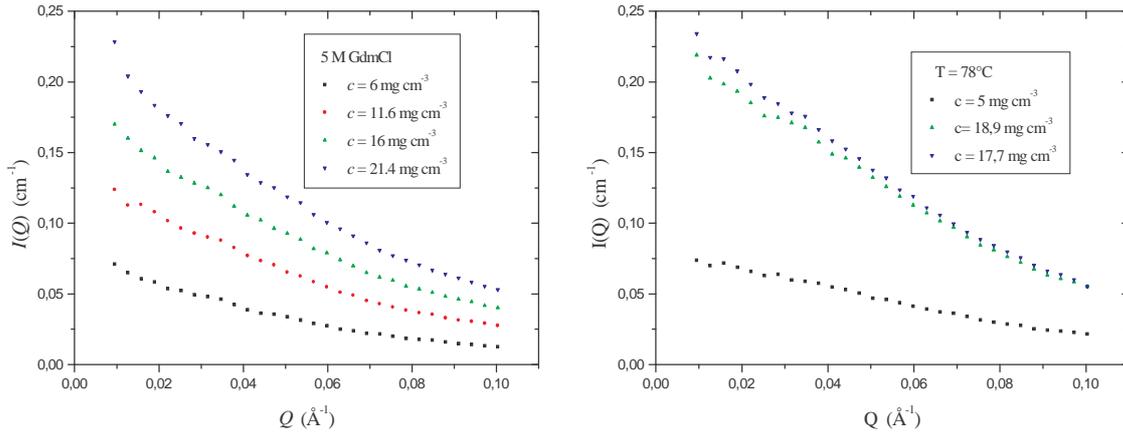


**Fig. 3.8** :.variation de la chaleur spécifique de la NCS en présence de 5 M de chlorure de guanidinium.

### 3.2.2 Rayon de giration et second coefficient du viriel

Comme pour la protéine native, des mesures de DNPA et de DXPA ont été réalisées sur des solutions de NCS complètement dénaturée par 5 M de GdnDCl ou par chauffage à plus de 78°C, afin de déterminer la conformation de la protéine complètement dépliée et les interactions intermoléculaires.

Les spectres de DNPA, présentés dans la figure 3.9, montrent que la taille de la NCS dénaturée est bien plus importante que celle de la protéine native. Pour expliquer ces résultats nous avons utilisé les considérations du paragraphe 2.4 concernant les polymères. Les valeurs du rayon de giration apparent et l'intensité diffusée vers l'avant ont été déterminées en utilisant la loi de Debye (1.54).



**Fig. 3.9 :** spectres de DNPA de la NCS dénaturée par 5 M de GdnDCl et par chauffage à 78°C.

Les figures 3.10 et 3.11 représentent les dépendances de  $c/I(0,c)$  et de  $[R_g(c)]^{-2}$  en fonction de la concentration de protéine. Les valeurs de l'intensité diffusée vers l'avant et du rayon de giration ont été obtenues par extrapolation linéaire à concentration nulle et celles des coefficients  $A_2$  et  $B_2$  ont été déduites des pentes de ces courbes.

Nous avons obtenu, pour la protéine en 5M de chlorure de guanidinium :

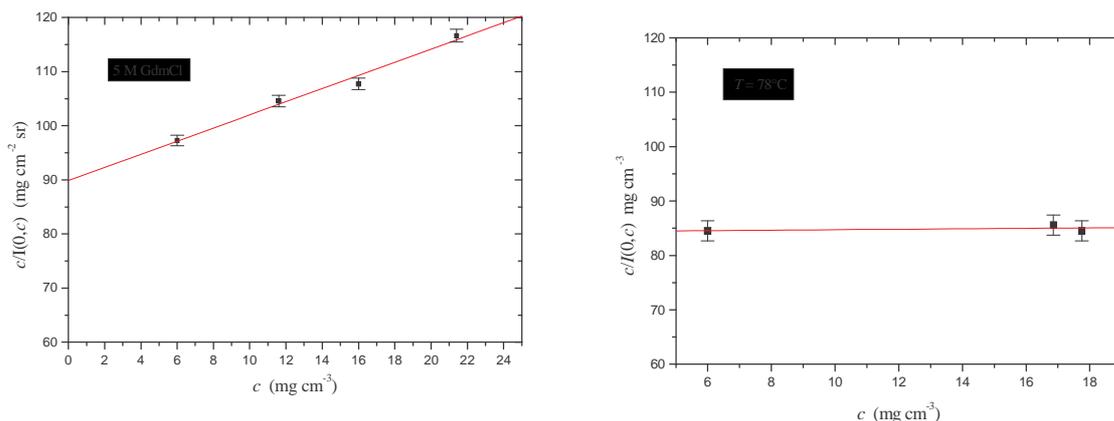
$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{I(0,c)}{c} = (11,1 \pm 0,2) \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ sr}^{-1}$$

$$A_2 = (6 \pm 1) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$$

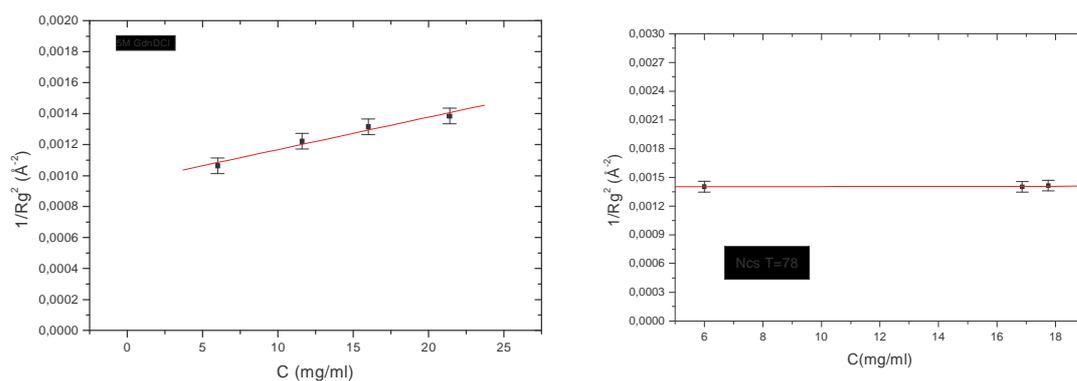
$$R_g(0) = (33 \pm 1) \text{ \AA}$$

$$B_2 = (9 \pm 2) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}.$$

En présence de 5 M de GdnDCl le rayon de giration de la NCS est presque trois fois supérieur à celui de la protéine native. Ce résultat démontre clairement que la NCS est très fortement dépliée. Le coefficient  $A_2$  est positif et sa valeur est aussi supérieure à celle de la protéine native. Les interactions intermoléculaires répulsives augmentent donc lorsque la protéine est fortement dépliée par 5 M de GdnDCl. Ces résultats suggèrent que, dans de telles conditions, *la conformation de la NCS est celle d'une chaîne à volume exclu.*



**Fig. 3.10 :** variation de l'intensité diffusée vers l'avant par la NCS complètement dépliée par 5 M de GdnDCl et par la chaleur à 78°C.



**Fig.3.11 :** variation du rayon de giration apparent de la NCS complètement dépliée par 5 M de GdnDCl et par la chaleur à 78°C.

Par contre la situation est différente lorsque la NCS est dénaturée par la chaleur. Comme le montrent les figures 3.10 et 3.11,  $R_g(c)$  et  $I(0,c)$  ne varient que faiblement avec la concentration de protéine. Dans ce cas nous obtenons :

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{I(0,c)}{c} = (11,8 \pm 0,2) \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1} \text{ sr}^{-1}$$

$$A_2 = (0,5 \pm 3) 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$$

$$R_g = (26,6 \pm 1) \text{ \AA}$$

$$B_2 = (-0.3 \pm 2) 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$$

La valeur du rayon de giration démontre que la NCS dénaturée par chauffage à 78°C est aussi fortement dépliée, mais moins qu'en présence de 5 M de GdnDCl. Le fait que les valeurs de  $A_2$  et  $B_2$  soient très faibles indique que les interactions intermoléculaires sont à peu près absentes et suggère que *la protéine dépliée se comporte comme une chaîne idéale*.

Une expérience similaire a été réalisée par DXPA à 76.8°C et à 80 °C sur une solution de NCS concentrée à  $c=5 \text{ mg cm}^{-3}$  dans un tampon à base d'eau légère. Le spectre de diffusion montre que la valeur du rayon de giration est:

$$R_g(c) = (26,3 \pm 0,3) \text{ \AA}.$$

Compte tenu des incertitudes expérimentales, cette valeur est identique à celle que donne la DNPA dans les mêmes conditions de concentration

Les valeurs expérimentales du second coefficient du viriel peuvent être comparées à celles données par l'expression (3.1). Pour des molécules linéaires, comme les polymères ou les protéines totalement dénaturées, la constante  $\Psi$  dépend de la longueur de la chaîne, de sa rigidité et de la force des interactions de volume exclu. En particulier,  $\Psi = 0$  pour une chaîne idéale. Lorsque des interactions de volume exclu sont présentes  $\Psi$  est toujours positif. Sa valeur est d'environ 0,23 pour une chaîne très flexible de longueur infinie (Yamakawa 1993). Lorsque la NCS est dénaturée par la chaleur à 78°C les résultats de DNPA montrent que  $\Psi = (0 \pm 0,025)$ . Par contre, à partir de la valeur de  $A_2$  déterminée expérimentalement et de l'expression 3.1, on obtient  $\Psi = (0,16 \pm 0,06)$  lorsque la dénaturation est provoquée par 5 M de GdnDCl. Ces valeurs tendent à confirmer que *la NCS dénaturée par la température se comporte comme une chaîne gaussienne, et que par contre, en 5M de GdnDCl, elle se comporte comme une chaîne polymérique en bon solvant, c'est-à-dire avec des interactions de volume exclu*. A partir de ces informations, nous allons déduire des caractéristiques structurales de la chaîne dépliée, par l'analyse des spectres de diffusion obtenus à grandes valeurs de  $Q$ , que nous présentons dans le paragraphe suivant.

### 3.2.3 Longueur de contour et longueur statistique

Nous avons utilisé certains résultats de la théorie des polymères pour expliquer les spectres de diffusion de la NCS complètement dépliée. L'application de ces résultats théoriques aux protéines mérite, dès à présent, quelques commentaires. Tout d'abord, les protéines sont des polymères hétérogènes, de longueur de chaîne constante. En conséquence, au voisinage des conditions de solvant  $\theta$ , certains résidus pourront se trouver en bon solvant alors que d'autres seront en mauvais solvant. Des interactions préférentielles apparaîtront donc entre ces derniers et favoriseront l'apparition de conformations particulières, qui sont très improbables pour les polymères homogènes. Ceci pourrait être à l'origine d'une certaine inadéquation entre modèle théorique et résultats expérimentaux. Ensuite, tous les modèles théoriques ne donnent que le facteur de forme d'une chaîne isolée et négligent les effets de concentration. L'idéal serait donc de comparer les prévisions théoriques aux spectres expérimentaux mesurés à très faible concentration. Ceci demanderait des expériences longues et délicates et serait cause de grandes incertitudes car il est difficile de mesurer précisément des spectres de diffusion à des concentrations suffisamment faibles. Afin de tenir compte des effets de concentration, nous avons donc utilisé l'expression (1.74) pour décrire les spectres mesurés. Dans cette expression nous avons remplacé les coefficients  $A_2$  et  $B_2$  par leurs valeurs expérimentales. Par ailleurs, nous avons négligé la contribution des deux boucles, de dix et cinq acides aminés, formées par les liaisons disulfure. La figure 3.12 représente schématiquement la conformation la plus étendue d'un tel diffuseur. Nous faisons l'hypothèse que la présence de ces deux boucles ne modifie qu'assez peu la forme du spectre de diffusion.



**Fig. 3.12.** Schéma de la NCS complètement dénaturée avec ses deux boucles dues à la présence des liaisons disulfure.

### 3.2.3.1. Facteur de forme de Sharp et Bloomfield pour une chaîne idéale

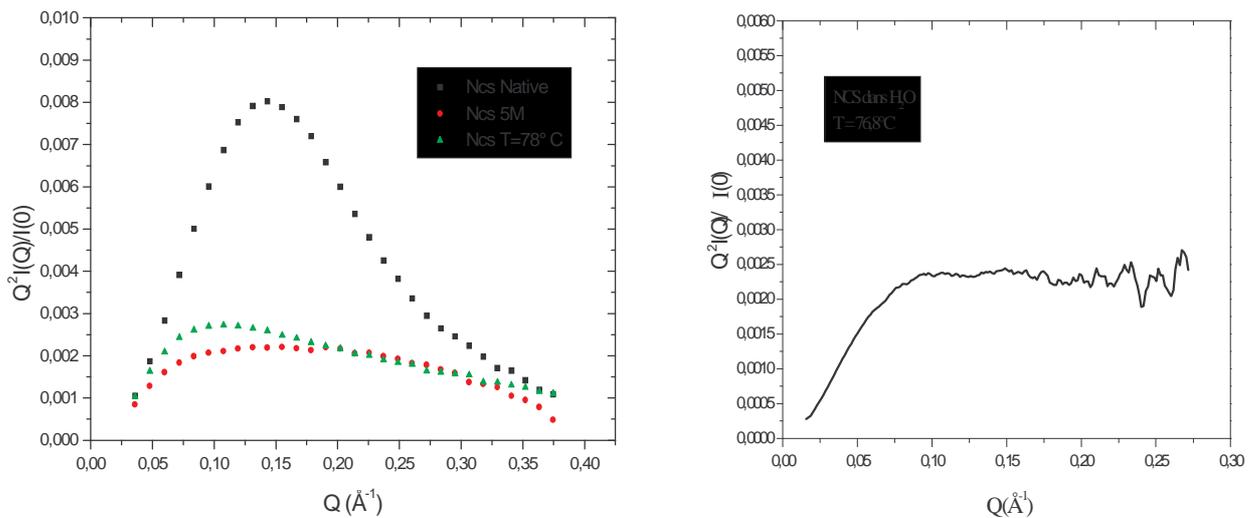
L'approximation la plus simple qui peut être utilisée pour décrire une chaîne polymérique semi-flexible de longueur finie est celle de Sharp et Bloomfield, donnée par l'équation (1.55). Une telle chaîne est décrite par trois paramètres fondamentaux : sa longueur curviligne,  $L$ , sa longueur statistique,  $b$ , et son rayon de giration transverse apparent,  $R_{g,c}$ .

La valeur de  $L$  donne une information sur le degré d'étirement de la chaîne. Lorsque la chaîne est complètement étirée, cette quantité peut être calculée à partir du nombre des acides aminés sachant que la distance entre deux liaisons peptiques consécutives est de l'ordre de 3,45 Å.

La longueur statistique  $b$  reflète la rigidité de la chaîne et définit les interactions à courte distance. Elle dépend, principalement, de la structure chimique de la molécule.

Enfin le rayon de giration transverse apparent  $R_{g,c}$  donne une estimation de la taille moyenne des groupes latéraux. Cependant sa valeur dépend fortement de la structure et de la composition chimiques de ceux-ci, ainsi que de la nature du solvant et de sa structure au voisinage de la molécule.

La figure 3.13 donne une représentation de Kratky des spectres de diffusion de la NCS dans diverses conditions. Les mesures de DNPA correspondent à l'état natif et aux états dénaturés induits par la présence de 5 M de GdnDCI et par la chaleur à 78°C. La concentration de protéine était d'environ 20 mg cm<sup>-3</sup>. Les mesures de DXPA ont été réalisées à 76,8°C, sans dénaturant et à une concentration de 5 mg cm<sup>-3</sup>. Les résultats de DNPA montrent que la structure de la chaîne dénaturée par 5 M de GdnDCI est différente de celle provoquée par la chaleur. Cela est compatible avec les informations acquises jusqu'à maintenant, à savoir que la NCS dénaturée thermiquement adopte une conformation de chaîne idéale alors qu'elle se trouve en situation de volume exclu lorsqu'elle est dénaturée par 5 M de GdnDCI. Le facteur de forme de Sharp et Bloomfield ne pourra être utilisé que pour décrire le cas de la chaîne idéale. Dans le cas de la chaîne à volume exclu, la valeur du paramètre  $b$ , issue d'une analyse du type S&B, serait affectée par les interactions à longue distance.



**Fig. 3.13 :** représentation de Kratky des spectres de diffusion de la NCS dans diverses conditions. A gauche : résultats de DNPA pour la protéine native, la protéine dénaturée par 5 M de GdnCl et par la chaleur à 78°C. A droite : ceux de DXPA obtenus à 76,8°C

Nous avons ajusté l'équation (1.55), qui décrit le facteur de forme de Sharp et Bloomfield, aux spectres de DXPA et de DNPA mesurés à haute température. Les coefficients  $A_2$  et  $B_2$  ayant été trouvés dans ces conditions voisins de 0, les spectres n'ont pas été corrigés des effets de concentration. Les ajustements ont été réalisés dans le domaine en  $Q$ :  $Q < 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ . Ils sont présentés sur la figure 3.14. Les valeurs suivantes ont été obtenues pour les trois paramètres  $L$ ,  $b$ , et  $R_{g,c}$  de l'ajustement :

dans le cas de la DXPA à 76.8°C

$$L = (322 \pm 68) \text{ \AA}$$

$$b = (13.0 \pm 2.9) \text{ \AA}$$

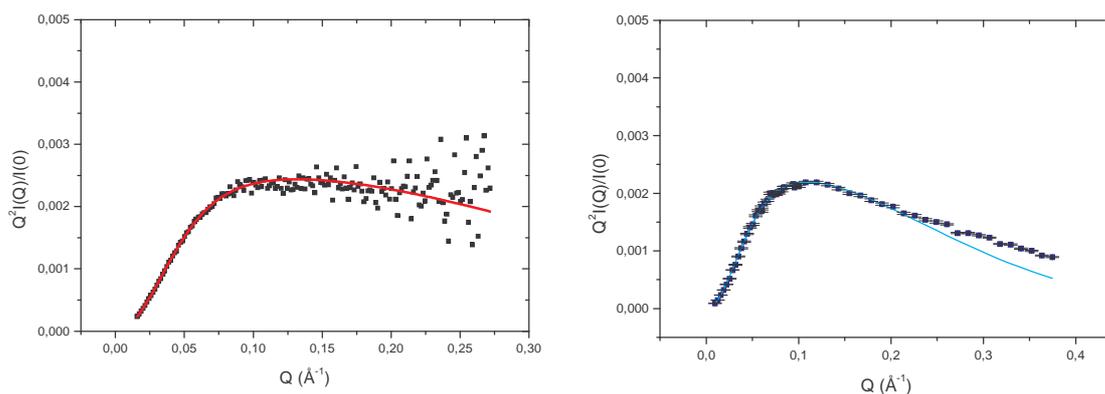
$$R_{g,c} = (4.1 \pm 0.3) \text{ \AA}$$

dans le cas de la DNPA à 78°C

$$L = (320 \pm 70) \text{ \AA}$$

$$b = (13.6 \pm 3) \text{ \AA}$$

$$R_{g,c} = (5.5 \pm 0.5) \text{ \AA}$$



**Fig.3.14 :** Ajustement du facteur de forme de Sharp et Bloomfield (2.63) aux résultats de DXPA et DNPA.

Les valeurs de  $L$  et  $b$  sont identiques en DXPA et en DNPA. La valeur de  $L$  est compatible avec celle qui peut être calculée pour une chaîne polypeptidique de 102 résidus, à savoir  $352 \text{ \AA}$  ( $102 \times 3,45 \text{ \AA}$ ). Il n'y a, en effet, pas de raison de tenir compte des 15 résidus impliqués dans les boucles formées par les liaisons disulfure car ils ne contribuent pas à la longueur totale de la chaîne dépliée. Ceci suggère que la NCS dénaturée par chauffage ne présente pas d'éléments particuliers de structure secondaire, puisque l'existence de tels éléments entraînerait une diminution de  $L$  par rapport à la valeur calculée de  $352 \text{ \AA}$ .

Les valeurs obtenues par les deux techniques pour  $R_{g,c}$  sont légèrement différentes. Cela n'est pas surprenant dans la mesure où  $R_{g,c}$  est fortement dépendant du *contraste local* entre la protéine et le solvant, et donc du type de technique, neutrons ou rayons X, utilisé.

La valeur moyenne du rayon de giration calculée à l'aide de l'expression

$$R_g^2 = b^2 \left( \frac{L}{6b} - \frac{1}{4} \right) + \frac{3}{2} R_{g,c}^2 \quad (3.3)$$

est d'environ  $26,1 \text{ \AA}$  pour les rayons X et  $26,9 \text{ \AA}$  pour les neutrons. Ces valeurs sont, comme il se doit, tout à fait comparables à celles déduites des mesures effectuées à de plus faibles valeurs de  $Q$  en utilisant la fonction de Debye.

Finalement il faut remarquer que les incertitudes d'environ 20% sur les valeurs de  $L$  et  $b$  proviennent du fait que  $c'$  est essentiellement le produit  $Lb$  qui intervient dans l'expression de Sharp et Bloomfield, et que la validité de cette dernière est limitée aux valeurs de  $Q < 0,2 \text{ \AA}^{-1}$ .

### 3.2.3.2. Facteur de forme de Pedersen et Shurtenberger

Pour décrire les spectres de DNPA obtenus pour la NCS dépliée par 5M de GdnDCI, nous avons utilisé la troisième approximation de Pedersen et Shurtenberger (Pedersen 1996) donnée dans le chapitre II. Cette approximation, qui représente le facteur de forme d'une chaîne avec ou sans volume exclu, s'applique dans un intervalle de  $Q$  plus large que celle de Sharp et Bloomfield.

Pour tenir compte des effets de concentration nous avons utilisé l'approximation (1.74) dans laquelle nous avons substitué à  $A_2$  et  $B_2$  leurs valeurs expérimentales et remplacé  $P(Q)$  par l'expression de Pedersen et Shurtenberger (Pedersen 1996).

Le spectre de diffusion de la NCS dénaturée par 5 M de GdnDCI ne peut être décrit correctement que par celui d'une chaîne à volume exclu. Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

$$L = (340 \pm 17) \text{ \AA}$$

$$b = (14,8 \pm 1,5) \text{ \AA}$$

$$R_{g,c} = (4.2 \pm 0.5) \text{ \AA}$$

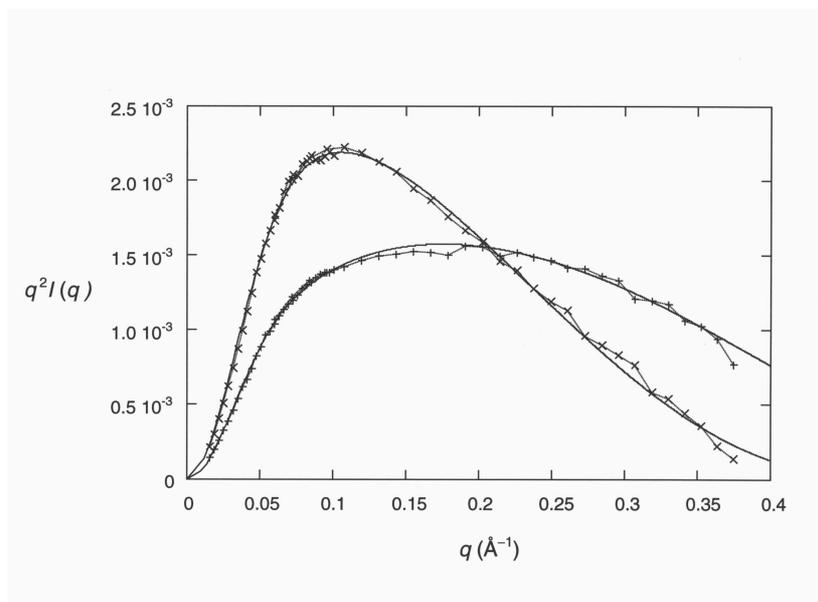
A titre de comparaison, nous avons également fait un ajustement du spectre de DNPA obtenu à 78°C en utilisant la troisième approximation de Pedersen et Shurtenberger. On observe à nouveau que la protéine dénaturée par la chaleur à 78°C se comporte comme une chaîne idéale. Les paramètres structuraux sont très voisins de ceux obtenus précédemment à partir de l'approximation de S&B, puisqu'ils sont égaux à:

$$L = (335 \pm 20) \text{ \AA}$$

$$b = (12,5 \pm 1,6) \text{ \AA}$$

$$R_{g,c} = (5.6 \pm 0.5) \text{ \AA}$$

La figure 3.15 montre le résultat des ajustements des expressions théoriques aux spectres expérimentaux.



**Fig. 3.15 :** ajustements des facteurs de forme de Pedersen et Schurtenberger aux spectres de DNPA de la NCS totalement dépliée par 5 M de GdnDCI (+) et par la chaleur à 78°C (x).

Les déterminations de la valeur de  $L$  pour les deux types de dénaturation, chimique et par chauffage, sont équivalentes et correspondent à celle d'une chaîne polypeptidique dépourvue de toute structure locale. De même, les valeurs de la longueur statistique  $b$  sont comparables. La valeur de  $b$  reflète les effets d'interactions à courte distance sur la chaîne qui lui confèrent sa rigidité. Dans tous les cas, les corrélations d'orientation persistent sur une longueur correspondant à 3 ou 4 acides aminés.

Enfin, il est actuellement impossible de déduire quoi que ce soit des valeurs de  $R_{g,c}$  car, comme nous l'avons déjà mentionné, elles dépendent fortement du contraste local entre la surface de la protéine et le solvant

### 3.3 Conclusions

Les expériences présentées dans ce chapitre nous ont permis de décrire plus précisément les propriétés de la NCS en solution, tant dans la forme native que dans l'état complètement déplié. En ce qui concerne ce dernier type de conformation nous avons apporté de nouvelles informations, résultant d'une analyse originale et précise des spectres de diffusion.

En premier lieu, nous avons montré que la stabilité de la NCS native est peu influencée par le pH de la solution entre pH=5 et pH=7, et nous avons déterminé son rayon de giration. En comparant les spectres de diffusion des rayons X et des neutrons à ceux calculés à partir de la structure atomique de la NCS, nous avons pu déterminer la densité de la couche d'hydratation, qui s'avère être environ 4 à 5 % plus dense que l'eau normale.

L'étude des états fortement dénaturés montre, qu'en présence de 5 M de chlorure de guanidinium, la protéine est complètement dépliée avec un rayon de giration qui est presque trois fois supérieur à celui de la forme native. Par contre, lorsque la protéine est dénaturée par la chaleur, à environ 78°C, son rayon de giration n'est qu'environ le double de celui de la forme native.

La mesure du second coefficient du viriel nous a permis d'estimer les interactions intermoléculaires lorsque la protéine est dénaturée par la chaleur et par du chlorure de guanidinium. Pour la protéine dénaturée par 5 M de GdnDCI, nous avons observé que les interactions sont très importantes et que les effets de concentrations ne peuvent pas être négligés ; par contre sous l'effet de la chaleur, à 78°C, la solution de protéine se comporte comme une solution idéale, c'est à dire sans interactions intramoléculaires. Ces résultats montrent directement que la protéine dénaturée chimiquement se comporte comme une chaîne polymérique à volume exclu dont tous les acides aminés sont entièrement solvatés. Par contre la protéine dénaturée thermiquement se comporte comme une chaîne idéale. Cette différence de conformation se reflète aussi dans les valeurs du rayon de giration.

Ce résultat est fondamental parce qu'il est souvent affirmé que les différences détectées entre ces deux types de conformations sont dues à la présence de structures secondaires locales dans la protéine dénaturée par la chaleur. Ce point de vue est essentiellement fondé sur l'utilisation de techniques expérimentales qui ne sont pas appropriées pour caractériser structurellement les états complètement dénaturés. Deux exemples peuvent être donnés. Dans le premier, il est observé que l'ajout d'un dénaturant à une solution de protéine déjà dénaturée thermiquement provoque la variation du signal mesuré, par exemple optique (Aune, 1967). Dans le second, il a été observé que la viscosité intrinsèque d'une protéine traitée par la chaleur est plus faible que celle dénaturée par du GdnDCI (Tanford, 1973). Ces variations peuvent en fait très bien être expliquées par des effets de solvation.

Nous avons démontré que *les deux types de conformations de la protéine complètement dépliée ne présentent pas de structure résiduelle* en déterminant la longueur de contour de la chaînes polypeptidique. Non seulement sa valeur est indépendante des conditions de dénaturation mais elle est aussi en complet accord avec la valeur calculée pour une chaîne en conformation  $\beta$  étirée. *De ces résultats nous concluons que la conformation d'une protéine globulaire dépend des conditions de dénaturation, mais qu'un état complètement déplié peut être obtenu tant à l'aide du GdmHCl que de la chaleur.*

De nombreuses études ont été faites sur des protéines dénaturées par du chlorure de guanidinium, mais très peu concernent les propriétés structurales. La présence d'interactions de volume exclu pour les chaînes polypeptidiques a déjà été mise en évidence par viscosimétrie. Par contre les propriétés structurales correspondantes ne l'ont été que pour la PGK (Receveur 1998) et la caséine  $\beta$ . Les spectres de diffusion des neutrons de ces protéines ont été décrits à l'aide du modèle de Pedersen et Schurtenberger (1996). Les conclusions qu'il est possible de tirer de ces résultats sont en parfait accord avec celles que nous avons obtenues ici pour la NCS.